

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21620111152499

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

P-TEFb 活性复合物组装的细胞定位研究

Cellular localization of the assembly of P-TEFb active complexes

周超

指导教师姓名: 陈瑞川 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学专业

论文提交日期: 2014 年 04 月

论文答辩时间: 2014 年 05 月

学位授予日期: 2014 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 05 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

英文缩略对照表	1
摘要.....	3
Abstract.....	4
第一章 前言	5
1.1 真核基因转录和 P-TEFb 活性调控机制.....	6
1.1.1 真核基因转录循环.....	6
1.1.2 RNA 聚合酶 II 活性调控	7
1.2 P-TEFb 复合体简介	11
1.2.1 P-TEFb 的发现、结构及其功能.....	11
1.2.2 P-TEFb 活性调控的信号通路和分子机制	12
1.3 P-TEFb 与其募集蛋白.....	15
1.3.1 P-TEFb 与 BRD4.....	15
1.3.2 BRD4 和 BET 家族蛋白	16
1.3.3 细胞对 BRD4 募集 P-TEFb 的调控.....	18
1.4 超级延伸复合物	18
1.4.1 人类和果蝇的超级延伸复合物的组成成分.....	18
1.4.2 超级延伸复合物与人类疾病.....	19
1.4.3 SECs 参与 RNAPII 介导的通用延伸	21
1.5 Nuclear speckles	22
1.5.1 Nuclear speckles 的发现	22
1.5.2 Nuclear speckles 的组成、结构和动态变化	23
1.5.3 Nuclear speckles 和 RNA Pol II、PTEFb 的关系.....	24
1.6 本课题研究的目标、内容和意义	24
第二章 实验材料与方法.....	26
2.1 实验药品、试剂与仪器	26
2.1.1 细胞株、菌株和质粒资源.....	26
2.1.2 主要试剂和材料.....	27
2.1.3 主要实验仪器和耗材.....	28
2.2 常用溶液配方	30
2.2.1 大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒转化相关溶液.....	30
2.2.2 质粒 DNA 制备相关溶液	30
2.2.3 质粒 DNA 亚克隆相关溶液	31
2.2.4 细胞培养、转染及感染相关溶液.....	31
2.2.5 生化实验相关溶液.....	32
2.2.6 Western blot 相关溶液	33
2.2.7 免疫荧光相关溶液配方.....	34
2.3 实验方法	34

2.3.1 大肠杆菌感受态细胞的制备.....	34
2.3.2 质粒转化.....	35
2.3.3 质粒 DNA 小量提取.....	35
2.3.4 质粒中量提取.....	36
2.3.5 DNA 限制性内切酶酶切.....	36
2.3.6 DNA 样品琼脂糖凝胶电泳.....	37
2.3.7 琼脂糖胶回收 DNA 片段 (QIAGEN 试剂盒)	37
2.3.8 DNA 连接.....	38
2.3.9 普通 PCR 反应.....	38
2.3.10 PCR 反应 (改进型 QuikChange 方案)	39
2.3.11 特异性 shRNA 的构建.....	40
2.3.12 细胞培养.....	41
2.3.13 细胞瞬时转染.....	41
2.3.14 病毒包装感染.....	41
2.3.15 细胞的药物处理.....	42
2.3.16 细胞裂解液.....	42
2.3.17 核分级分离(Nuclear fractionation).....	42
2.3.18 免疫共沉淀.....	42
2.3.19 SDS-PAGE 蛋白电泳	44
2.3.20 免疫荧光实验(Immunofluorescence).....	44
2.3.21 免疫印记实验 (Western blot)	44
第三章 结果与讨论	46
3.1 在应激条件下, 两种复合物 (BRD4/P-TEFb 复合物和 ELL2/AFF4/P-TEFb 复合物) 组分 在 speckles 中的共定位情况.....	46
3.2 BRD4 的溴结构域对 BRD4 定位于 speckles 无影响	50
3.3 CDK9 是 BRD4 定位于 speckles 的关键因子	51
3.4 探讨 CyclinT1 定位于 speckles 中的机制.....	53
3.5 ELL2 将 CyclinT1 募集到 speckles 中.....	55
3.6 CDK9 定位于 speckles 的机制探索.....	57
3.7 AFF4 定位于 speckles 机制的探讨.....	59
3.8 讨论和展望	61
参考文献	64
致谢.....	71

Contents

Abbreviation.....	1
Abstract in Chinese.....	3
Abstract in English	4
Chapter I Forewords.....	5
1.1 Transcription in eukaryotes and regulatory machinery of P-TEFb complex	6
1.1.1 Steps of transcription mediated by RNA Pol II in eukaryotes	6
1.1.2 Regulation of RNA Pol II catalytic activity.....	7
1.2 Introduction of P-TEFb complex	11
1.2.1 Discovery of P-TEFb and its structure,its function	11
1.2.2 Signaling pathway and molecular mechanism for the regulation of P-TEFb activity in cell	12
1.3 P-TEFb and recruitment factor.....	15
1.3.1 P-TEFb and BRD4	15
1.3.2 BRD4 and BET family protein	16
1.3.3 Regulation of P-TEFb recruited by BRD4 in cell	18
1.4 Super Elongation Complexes	18
1.4.1 Compositions of human and Drosophila super elongation complex ..	18
1.4.2 Super elongation complexes and human diseases.....	19
1.4.3 Targeting SECs to RNA polymerase II for general elongation	21
1.5 Nuclear speckles	22
1.5.1 Discovery of Nuclear speckles.....	22
1.5.2 Composition,Structure and dynamics of speckles	23
1.5.3 The relationship between Speckles andRNA pol II/PTEFb	24
1.6 Aims, content and significance of the project.....	24
Chapter II Materials and methods	26
2.1 Reagents and instruments	26
2.1.1 Cell lines, E.coli and plasmids	26
2.1.2 Reagents and materials.....	27
2.1.3 Instruments and expendable supplies.....	28
2.2 Instruments and solutions	30
2.2.1 The solutions for preparation of competent E.coli cells	30
2.2.2 The solutions for preparation of DNA	30
2.2.3 The solutions for subclone	31
2.2.4 The solutions for cell culture, transfection and infection.....	31
2.2.5 The solutions for bichemistry experiment	32
2.2.6 The solutions for Western Blot	33
2.2.7 The solutions for Immunofluorescence.....	34
2.3 Protocols and recipes	34
2.3.1 Preparation of competent E.coli cells	34
2.3.2 Plasmids transformation.....	35
2.3.3 Small-scale plasmid DNA extraction.....	35
2.3.4 Medium -scale plasmid DNA extraction	36

2.3.5 DNA Restriction endonuclease digestion of DNA	36
2.3.6 Agarose gel electrophoresis DNA sample	37
2.3.7 DNA Extraction from Agarose Gel (by QIAGEN Kit)	37
2.3.8 DNA ligation.....	38
2.3.9 Polymerase chain reaction	38
2.3.10 PCR mutagenesis (by modified QuikChange Site-Directed Mutagenesis)	39
2.3.11 Construction of the specific shRNA	40
2.3.12 Cell culture	41
2.3.13 Transient transfection of HeLa cell.....	41
2.3.14 Lenti-Virus transfection of 293T and infection of HeLa cell	41
2.3.15 Pharmacological induction.....	42
2.3.16 Whole cells lysate	42
2.3.17 Modified Nucleic fractionation	42
2.3.18 Co-Immunoprecipitation purification	42
2.3.19 SDS-PAGE	44
2.3.20 Immunofluoresence.....	44
2.3.21 Western blot	44
Chapter III Results and Discussion.....	46
3.1 Under stress conditions, the components of BRD4/P-TEFband ELL2/AFF4/P-TEFb accumulate in speckles.....	46
3.2 The Bromodomains of BRD4 can not influence the recruitment of BRD4 into speckles.....	50
3.3 CDK9 recruit BRD4 into speckles.....	51
3.4 To investigate the mechanism of CyclinT1 into speckles	53
3.5 ELL2 raises CyclinT1 into speckles	55
3.6 To investigate the mechanism of CDK9 into speckles	57
3.7 To investigate the mechanism of AFF4 into speckles	59
3.8 Discussion and Outlook	61
Reference	64
Acknowledgement.....	71

英文缩略对照表

Abbreviation	Full Name
7SK snRNP	7SK small nuclear ribonucleoprotein
ActD	Actinomycin D
ATP	Adenosine-triphosphate
BD (I,II)	Bromodomain (I,II)
BET	Bromodomains and extraterminal
BRD4	Bromodomain-containing protein 4
CAK	CDK-activating kinase
CDKs	Cyclin-dependent kinases
CTD	C-terminal domain
CTM	C-terminal motif
DRB	5,6-dichloro-1-b-D-ribofuranosyl-benzimidazole
DSIF	DRB-sensitivity inducing factor
ET	Extraterminal
GTF	General transcription factor
HDAC	Histone deacetylase
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1
HMBA	Hexamethylene bisacetamide
HPV	Human papillomavirus
HSEN	High Salt Extracted Nucleic
HSF	High salt fraction
LPS	Lipopolysaccharide
LSEN	Low Salt Extracted Nucleic
LSF	Low salt fraction
MAT1	Ménage a trois
MePCE	Methylphosphate Capping Enzyme
NE	Nuclear extraction
NELF	Negative elongation factor
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
PAFc	Polymerase-Associated Factor complex

PCR	Polymerase Chain Reaction
PCV	Packed cell volume
PH	Pleckstrin-homology
PIC	Preinitiation complex
PID	P-TEFb interaction domain
Pol II	RNA polymerase II
PP1 α	Protein phosphatase 1 α
PP2B / CaN	Protein phosphatase 2B /Calcineurin
P-TEFb	Positive transcription elongation factor b
SECs	Super elongation complexes
snRNP	Small nuclear ribonucleoprotein particle
TAR	Transacting-response
TBP	TATA box-binding protein
TEC	Transcript elongation complex
TF II (D, B, E, F, & H)	Transcription factor II (D, B, E, F, & H)
UV	Ultraviolet

摘要

P-TEFb 复合体是调控真核基因转录延伸的重要转录因子。P-TEFb 以两种形式存在于细胞内，第一种形式是与 7SK 和 HEXIM1 形成无活性 7SK snRNP 复合体；另一种形式是有转录活性的复合体。P-TEFb 与 BRD4 结合，形成 BRD4-PTEFb 是最早发现的活性复合物。最近研究发现 P-TEFb 也与 ELL2 和 AFF4 形成新型活性复合物，也就是超级延伸复合物（简称 SECs），这类复合物还包含 ENL、AF9、AFF1 等因子^[1-4]。鉴于 P-TEFb 和 SECs 在转录延伸过程中的重要作用，本实验室前期已对 P-TEFb 无活性复合体（7SK snRNP）与活性复合体（BRD4/P-TEFb, SECs）如何相互转化以及 P-TEFb 如何被募集到染色体上进行了相关研究，并且发现他们被调控的信号通路及其分子机制。然而，对于 P-TEFb、BRD4、ELL2 及 AFF4 等因子发生整合的场所却并不清楚。据文献报道，nuclear speckles 是组装、储存、修饰剪接因子的空间^[5]。因此，我们推测，nuclear speckles 是否也是 P-TEFb 活性复合物发生整合的场所？本文主要围绕 P-TEFb、BRD4 和 SECs 是否是在 nuclear speckles 中发生整合以及它们整合的分子机制等科学问题进行初步探究。本研究以稳定表达 Flag-CDK9 的 F1C2 和 HeLa 细胞株为实验模型，通过基因体内过表达、基因沉默及免疫荧光等实验技术和方法，发现了两种与转录延伸过程密切相关的复合物（BRD4/P-TEFb 和 SECs）中的 BRD4、CyclinT1、CDK9 及 AFF4 都能定位于 speckles。在应激条件下，这些因子会不同程度的在 speckles 中聚集。对这些因子定位于 speckles 的分子机制探索的过程中发现，CDK9 通过与 BRD4 的 PID 结构域结合，从而将 BRD4 募集到 speckles 中。同时研究发现 BRD4、CyclinT1、AFF4、ENL 的沉默不影响 CDK9 定位于 speckles。而 CyclinT1 则是通过其 501-530 区域与 ELL2 结合，被 ELL2 募集到 speckles 中。最后我们发现 CDK9、ELL2 不是 AFF4 定位于 speckles 的关键因子。本文发现了 P-TEFb 活性复合物被募集整合的场所，并且对其整合的机制进行了初步的探究，为进一步揭示和完善 P-TEFb 活性调控的分子模式和基因转录的分子机制有重要意义。

关键词：P-TEFb；SECs；Nuclear speckles

Abstract

P-TEFb is a critical elongation factor for the control of transcription elongation in eukaryotes. There are two forms of P-TEFb in cells. The first form is inactive 7SK snRNP complex containing other factors such as 7SK and HEXIM1. The second form is a transcriptionally active complex. The first discovered active complex is formed by P-TEFb and BRD4. Recent studies have identified another transcriptionally active complex, the super elongation complexes (SECs), which contains P-TEFb, AFF4, Ell2, as well as ENL, AF9, AFF1 and other factors. Previous studies in our lab revealed the signaling pathways and molecular mechanisms of how the P-TEFb inactive complex (7SK snRNP) and the active complex (BRD4/P-TEFb, SECs) were converted into each other. But it is not clear where is the integration site of these factors. It was reported that nuclear speckles may function in the storage/assembly/modification of splicing factors. We suspect that nuclear speckles is the integration place of the transcription elongation factors. Hence, the current study mainly focuses on two respects, namely whether the components of the two types of active P-TEFb complexes co-localized in nuclear speckle domains, and what are the mechanisms for their integration in nuclear speckles. Normal HeLa cell and F1C2 cell strain with stably expression of Flag-CDK9 were used as our research models. With overexpression, knockdown, and immunofluorescence techniques, we found that BRD4/CyclinT1/CDK9/AFF4 are present in nuclear speckles. Under stress conditions, these factors will have different degrees of aggregation in the nuclear speckles. Remarkably, we found that CDK9 is essential for BRD4's localization in the speckles by binding the PID domains of BRD4. However, BRD4, CyclinT1 are not required for the localization of CDK9 into speckles. And CDK9 or ELL2 is not the critical factor for recruiting AFF4 into nuclear speckles. Notably, ELL2 is essential the localization of CyclinT1 to speckles by binding to the 501-530 area of Cyclin T1. In summary, this study showed that speckles are the integration place of the activate P-TEFb complexes, and preliminary results indicate that the integration mechanism of the different complexes are distinct. These results are important for completing the full molecular model of the regulation of P-TEFb's activity and for an in-depth understanding of the molecular mechanism of gene transcription.

Key words: P-TEFb; SECs; Nuclear speckles

第一章 前言

在真核细胞中，绝大多数基因的转录都是由RNA聚合酶II（RNA Pol II）负责执行^[6]，并由一系列有序及复杂的调控机制来完成。科学家将这一过程划分为五个阶段：转录起始复合物（PIC）组装、转录起始、启动子区清扫、转录延伸、转录终止^[7, 8]。在过去近二十年里，科学家们认为转录起始复合物的组装是调控基因转录的关键过程，而Pol II介导的转录延伸阶段，则被认为是一个不受调控而只是机械地添加碱基直至产生全长mRNA的过程。然而，近年来，随着科学家对转录调控机制研究的深入，逐渐认识到转录延伸同样是受严格调控的，其调控机理或许是较转录起始更为复杂^[8]的过程，并且与mRNA加帽、剪辑和加尾等过程紧密相连。直到正性转录延伸因子b（Positive Transcription Elongation Factor b，P-TEFb）的发现，人们才对转录延伸调控有突破性的认识。

P-TEFb复合体是调控真核基因转录延伸的核心转录因子，不仅参与调控细胞增殖、胚胎发育等相关基因的转录表达，也与艾滋病、心肌肥大及肿瘤等恶性疾病的发病机理密切相关。近年来大量的研究报道已经逐渐揭示出P-TEFb复合物活性调控的信号途径。在细胞内，P-TEFb以无活性和活性复合物两种形式存在，它们之间可以通过相互转化以达到动态平衡。本实验室前期研究发现，在应激条件下，PP2B和PP1a两条信号通路协同调控P-TEFb从7SK snRNP无活性复合物中解离，随后BRD4将P-TEFb募集到染色质上进行转录延伸。除BRD4-PTEFb这类活性复合物之外，最新研究发现P-TEFb也参与形成超级延伸复合物（SECs）^[4]，并且这类新的复合物，也在转录延伸过程中发挥重要的作用。在前期研究过程中，人们将精力主要集中在它的组成成分以及作用机制上。而对于这两类活性复合物的组装场所并不知晓。因此，本文着力于通过免疫荧光等技术和方法，重点研究这两类活性复合物重活化的场所及相关的调控机制，为进一步阐释真核基因转录的调控机理提供帮助，由此衍生的药物靶点筛选模型提供可靠的理论基础。

1.1 真核基因转录和 P-TEFb 活性调控机制

1.1.1 真核基因转录循环

真核基因的转录是由一系列紧密衔接和精密调控的循环过程构成的平行或顺序发生的事件,包括转录起始复合物组装、转录起始、启动子区清扫、转录延伸、转录终止五个过程,随后重新进入新的循环,准备下一次的转录起始(如图 1.1)。转录起始复合物(PIC)先组装,TFIID的TBP亚基先结合到核心启动子区TATA BOX,并将Pol II、TFIIE和TFIIB、TFIIF和TFIIH、GTF、SRB(RNA聚合酶B突变体抑制子)^[9-12]、SWI/SNF染色质重构蛋白构成的全酶组分,以及GCN5组蛋白乙酰转移酶等募集到启动子附近^[13],形成稳定的转录起始复合物^[14-16]。通过TFIIE和TFIIH的解螺旋酶和ATPase活性功能,将ATP水解所释放的能量,使双螺旋DNA熔解形成单链转录泡,暴露出模板链和转录起始位点,便于RNA Pol II与DNA模板形成复合物,随后新合成的两个核苷酸与染色单体结合并产生第一个磷酸二酯键^[16-18]。同时,TFIIH的亚基CDK7磷酸化Pol II C末端结构域(CTD)的第五位丝氨酸(Ser5)并将启动子区裸露出来^[19],PIC发生部分解体,在转录延伸复合体(TEC)上只保留TFIIF,Pol II向前移动,合成新的mRNA,而启动子区的TFIID、TFIIH等转录因子发挥着空间骨架结构的作用,有助于形成新的转录起始复合体,以免不完整转录的产生^[15, 20-23]。启动子清扫完成后,当RNA合成到23nt时,DISF, NELF等抑制因子与Pol II结合,转录暂停,形成稳定的转录延伸复合物TEC(Transcription Elongation Complex)^[24]。随后加帽酶结合在Pol II CTD上使新生的RNA链5'端完成加帽^[25];同时,通过募集P-TEFb使DISF、NELF和Pol II CTD第二位丝氨酸(Ser2)被磷酸化,TEC从抑制状态转变为活性状态,转录得以继续,开始延伸全长的RNA^[26]。高度磷酸化的CTD可以募集RNA剪辑复合体以及3'末端切除、加polyA尾等相关的因子并增强它们的活性,从而产生成熟的RNA。最后,转录终止,释放全长RNA产物^[27]。由此看来,真核基因转录调控的过程实质上是调控Pol II的活性,并通过Pol II募集特异性的相关性蛋白来执行相应的功能从而实现基因转录的循环。

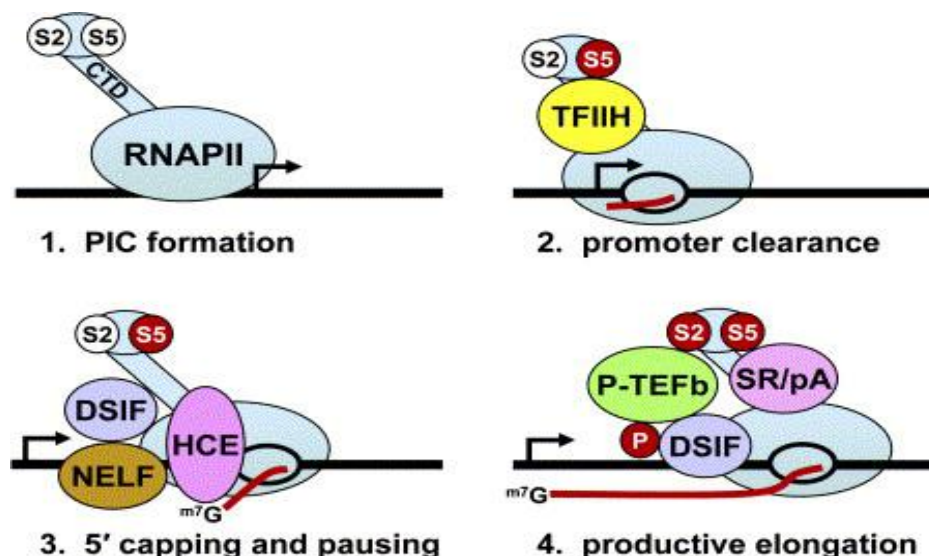


图1.1 RNA Pol II CTD调控的真核基因转录循环^[28]

Fig 1.1 The cycle of eukaryotic genes transcription regulated by RNA Pol II

1.1.2 RNA 聚合酶 II 活性调控

真核细胞中，存在着3种RNA聚合酶，分别是RNA聚合酶I、II、III。RNA聚合酶I定位于细胞核的核仁中，负责5.8S rRNA、18S rRNA和28S rRNA的合成；RNA聚合酶II存在于细胞核的核质中，主要合成mRNA和snRNA；RNA聚合酶III主要存在于细胞核的核质中，主要负责tRNA、5SrRNA以及一些稳定的小分子RNA的合成。

目前，酵母的Pol II研究较为清楚，其总分子量500KD，由12个亚基（Rpb1～12）组成。亚基分子量从8kDa至192kDa不等，功能各异。Pol II大亚基Rpb1主要作用是结合DNA，参与起始位点的选择^[29]。其C末端较Pol I和Pol III多出一段序列，即CTD结构域，是一个由7个氨基酸YSPTSPS（Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser）多肽重复串连的序列。在不同种属间，这段7个氨基酸多肽重复序列高度保守，但拷贝数不同。出芽酵母的Pol II CTD含26～27个拷贝，果蝇42个，哺乳动物有52个。并且，维持细胞正常生理功能的拷贝数也是有严格要求，例如酵母需要9个，人类细胞的存活至少需要28个拷贝^[30, 31]；而当老鼠仅有39个拷贝时，其新生期死亡率或生长退化明显增加^[32]。由此可见，CTD所含7肽重复序列的完整性是对于Pol II的功能、细胞乃至生物体都至关重要。

研究表明，真核生物 mRNA 的转录起始、延伸等过程都与 Pol II 紧密相关，

并且这些过程大多是由 Rpb1 的 CTD 结构域介导。在真核生物基因转录过程中, Pol II 通过募集不同的转录因子来参与 mRNA 加帽、剪切拼接等过程。Pol II 的活性是通过 CTD 的磷酸化状态变化决定的。在真核生物基因转录过程中, CTD 呈现着磷酸化和去磷酸化的循环(如图 1.2)过程^[33]。有 5 个磷酸化位点存在于 CTD 的 7 肽重复序列 Y1-S2-P3-T4-S5-P6-S7 中, 分别是 Y1, S2, T4, S5, 和 S7, 而一般情况下, 磷酸化主要是发生在 S2 和 S5 上^[27]。在转录起始复合物 PIC 中, CTD 处于较低的磷酸化水平, 转录起始后激酶 CDK7^[34]、CDK8^[35]和 CDK9^[36]特异性地磷酸化 CTD 的 7 肽重复序列。CDK7 是 TFIIH 的组分之一, 当与 MAT1 及 Cyclin H 组成 CAK 复合体时, 可磷酸化并激活 CDK1、CDK2、CDK4 和 CDK6 等细胞周期依赖性激酶, 参与细胞周期的调控过程^[37]。在转录起始阶段, CDK7 与 TFIIH 结合形成复合物, 能特异性地磷酸化 CTD 上 Ser5, 之后启动子区彻底暴露, 一些转录抑制因子被募集, 转录暂停, 新生 RNA 开始加帽^[38]。最新的研究发现, CDK8 是中介体复合体(Mediator)的组分之一, 作为其它转录相关因子的连接蛋白, 能特异性的磷酸化 CTD 的 Ser5^[35]。新生 RNA 完成加帽后, CDK9 磷酸化 CTD 上 7 肽重复序列的 Ser2 和相关的蛋白因子(例如 DISF 和 NELF), 使转录重新启动并偶联 RNA 成熟和加工机制, 边延伸边加工 RNA。转录结束后, Pol II 从 DNA 上解离下来, 蛋白磷酸酶 FCP1 使 CTD 去磷酸化^[39]; 除 FCP1 外, CPLs、Ssu72 和 PP1 等蛋白磷酸酶也能使 CTD 去磷酸化^[40]。综上所述, Pol II 介导的真核基因转录过程中, 除了 CTD 的 7 肽重复序列的拷贝数被严密调控之外, 对 CTD 的磷酸化水平以及特异位点的磷酸化的调控同样是核心过程。

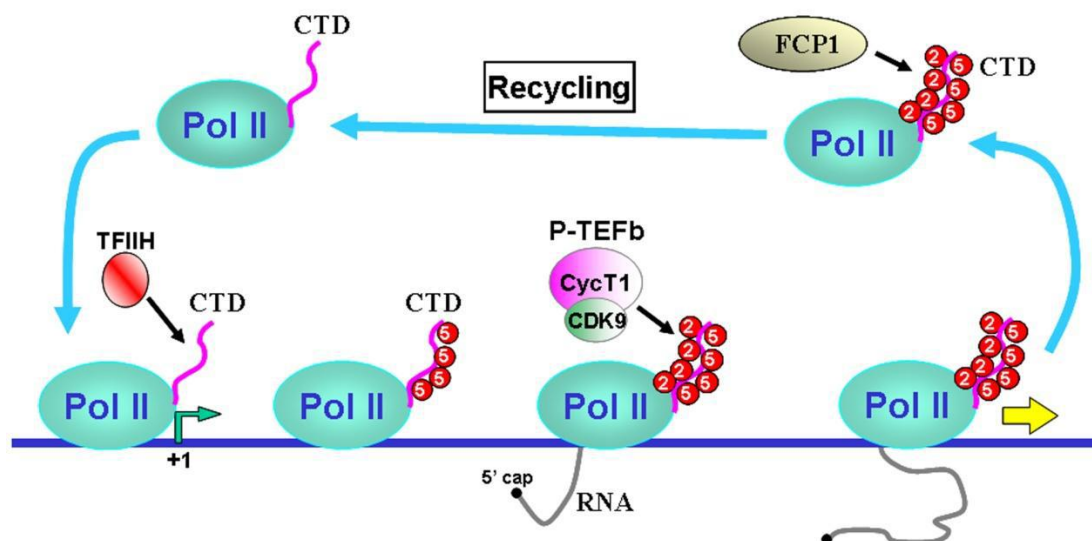


图 1.2 RNA Pol II CTD 磷酸化循环^[33]

Fig 1.2 The phosphorylation cycle of the CTD in the large subunit of RNA Pol II.

真核生物的转录延伸是一个极其复杂精密的过程。在此过程中，Pol II以磷酸化的CTD为平台，通过募集相关转录延伸因子和辅因子来调控延伸阶段中的不同过程。这些因子，既有直接调控Pol II酶活性的蛋白，也有通过结合Pol II调控转录延伸复合物TEC按照时序性组装的蛋白。不同蛋白通过不同空间结构的组装所形成的TEC的功能也不同：有的导致基因转录暂停；有的参与转录的重新启动；有的则调控新生RNA的加工修饰及运输（见表1）。因此，贯穿整个转录延伸过程的TEC多样性，是确保基因转录完整性的关键因素。P-TEFb复合体就是能与Pol II结合的蛋白之一，它能刺激Pol II产生全长转录产物，是真核基因转录延伸过程中最重要的正性转录因子之一。

表1 RNA聚合酶II结合的转录延伸因子及辅助因子^[8]

Table1 Transcription elongation factors and cofactors that associate with RNA polymerase II

延伸因子	亚基	正性/ 负性	特征
TFIIF	RAP30 RAP74	正性	参与起始前复合体的形成，重启转录暂停， 提高 Pol II 转录速率，调控 TFIIS
Elongins	Elongin A	正性	重启转录暂停，提高 Pol II 转录速率，泛素化

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库